

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso

**Caracterização do antígeno OmpL37 como candidato à
vacina recombinante contra leptospirose**

Thaís Larré Oliveira

Pelotas, 2012

THAÍS LARRÉ OLIVEIRA

**Caracterização do antígeno OmpL37 como candidato à vacina recombinante
contra leptospirose**

Trabalho Acadêmico apresentado
ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin
Orientadora de Estágio: Dra. Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, agosto de 2012.

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

O48c Oliveira, Thaís Larré

Caracterização do antígeno OmpL37 como candidato à vacina recombinante contra leptospirose / Thaís Larré Oliveira ; orientador acadêmico Odir Antônio Dellagostin ; orientador de estágio Daiane Drawanz Hartwig. Pelotas, 2012. 46f. : il - Monografia (Conclusão de Curso em Biotecnologia) –Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1. Leptospirose 2. OmpL37 3. Vacina recombinante de DNA
4. Vacina recombinante de subunidade I. Dellagostin, Odir Antônio (orientador) II. Hartwig, Daiane Drawanz (orientador) II- I. Título.

CDD 614.47

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride

MSc. Samuel Rodrigues Felix

MSc. Kátia Leston Bacele

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (orientador)

Dedicatória

À minha mãe, pela educação, pelo amor sem medidas, e por ter me apresentado ao meio acadêmico, à ciência e à Biotecnologia.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar um curso de graduação de qualidade, do qual me orgulho de ter feito parte e com o qual me realizei;

Ao meu orientador, Prof. Odir Antônio Dellagostin, pela orientação e oportunidade de estágio logo no início do curso, fundamental na minha formação, por todos os ensinamentos e pelo exemplo de competência e profissionalismo;

À minha orientadora de estágio, Daiane Drawanz Hartwig, pela paciência, cobrança e confiança em mim depositada durante a realização dos experimentos, pelo incentivo e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos durante estes 4 anos;

Aos meus pais, Cristina e Valter, e à minha amada irmã Júlia, por serem o alicerce dessa conquista, pela minha formação, pelos princípios que me transmitem todos os dias e pelo amor incondicional. Em especial à minha mãe, meu exemplo de determinação, força e coragem, por tudo que sou hoje, pelo empenho na realização dos meus sonhos e por estar ao meu lado em todos os momentos;

Aos meus avós Vilma, Ruben e Joci, e às minhas tias Clarisse, Gilma e Delânia, pelo amor, pela presença constante e pela grande torcida pelo meu sucesso;

Ao André, por todo o amor, carinho, dedicação, incentivo e paciência. Por ter sido muito mais do que namorado, por ter sido meu amigo, companheiro e colega de profissão, por acreditar em mim, e pelos ótimos momentos vividos neste período;

Às minhas amigas, Carolina, Estefânia, Isadora e Alice, pela compreensão, amizade sincera, torcida e por estarem sempre comigo;

Aos colegas de graduação, por terem compartilhado comigo momentos únicos, especialmente à Carol Lucas e à Carol Ximendes. Agradeço também à Ingrid, ao Elias e à Elisa, que escolheram outros caminhos, mas que foram muito importantes durante esta etapa, tornando-se inesquecíveis;

Aos colegas do laboratório de Vacinologia, em especial aos amigos Amilton, Samuel, Michel, Juliana, Mariana, Fernanda, Carolina, Kátia, Sérgio, Karen, Kaká e Michele, pela ajuda, palavras de incentivo, estímulo e pelo convívio agradável;

Ao Amilton, à Mariana, ao André, à Daiane e ao Marcelo, do laboratório de Imunologia Aplicada, por todo o auxílio dedicado para realização deste trabalho;

Aos funcionários do Biotério Central pela dedicação, disponibilidade e cuidados com os animais de experimentação, fundamentais neste e em outros trabalhos;

Aos demais amigos, colegas, funcionários e professores do Núcleo de Biotecnologia pela boa convivência, amizade e aprendizado;

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Muito obrigada!

OLIVEIRA, Thaís Larré. **Caracterização do antígeno OmpL37 como candidato à vacina recombinante contra leptospirose**. 2012. 46f. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Resumo

Espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* são bactérias causadoras da leptospirose, uma zoonose emergente responsável por mais que 500 mil casos ao ano em humanos. Esforços para o desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose tem focado em proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins*_OMPs) conservadas entre os mais de 250 sorovares de *Leptospira*. Essas proteínas são alvos em potencial por serem passíveis de reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. A proteína OmpL37 é reconhecida por soro convalescente humano e animal e possui propriedade de ligação aos componentes da matriz extracelular, podendo desempenhar um papel importante na patogênese da doença. Neste trabalho, clonamos o gene *ompL37* no vetor pAE para obtenção de uma vacina de subunidade, e no vetor pTargetT para obtenção de uma vacina de DNA. A proteína recombinante OmpL37 (rOmpL37) foi caracterizada por *Western blot* (WB) com soro humano convalescente e anticorpo anti-histidina. Posteriormente, esta proteína foi utilizada na imunização de camundongos para obtenção de soro hiperimune anti-rOmpL37, o qual foi avaliado por ELISA e WB. A funcionalidade da construção pTargetT/*ompL37* foi avaliada através da transfecção de células CHO-K1, seguida de imunofluorescência com o soro hiperimune anti-rOmpL37 produzido. Ambas as construções foram funcionais e capazes de expressar a proteína em células procarióticas ou eucarióticas. A proteína rOmpL37 mostrou-se antigênica e imunogênica, tornando promissora sua utilização como vacina contra leptospirose.

Palavras-chave: leptospirose, OmpL37, vacina de subunidade, vacina de DNA.

OLIVEIRA, Thaís Larré. **Characterization of OmpL37 antigen as a candidate for recombinant vaccine against leptospirosis**. 2012. 46f. Trabalho Acadêmico – Curso de Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Abstract

Pathogenic spirochetes from the genus *Leptospira* are the bacteria that cause leptospirosis, an emerging zoonosis responsible for over 500,000 human cases each year. Efforts to develop recombinant vaccines against leptospirosis have focused on the outer membrane proteins (OMPs) that are conserved among more than 250 *Leptospira* serovars. These proteins represent potential targets for immune-mediated host defense mechanisms. The protein OmpL37 is recognized by convalescent human and animal sera, binds to extracellular matrix components, and probably plays an important role in the pathogenesis of leptospirosis. The *ompL37* gene was cloned into pAE and pTargetT vectors, to obtain a subunit and a DNA vaccine, respectively. The recombinant protein OmpL37 (rOmpL37) was characterized by Western blot (WB) with human convalescent sera and anti-histidine and then used to immunize mice to obtain hyperimmune serum anti-rOmpL37, which was evaluated by ELISA and WB. The construct pTargetT/*ompL37* was evaluated by transfection of CHO-K1 cells and analyzed by immunofluorescence with anti-rOmpL37 hyperimmune serum. Both constructs were functional, and were able to express OmpL37 in prokaryotic or eukaryotic cells. The rOmpL37 was antigenic and immunogenic, making it a promising vaccine candidate against leptospirosis.

Keywords: leptospirosis, OmpL37, subunit vaccine, DNA vaccine.

Lista de Figuras

Figura 1: Clonagem do gene <i>ompL37</i> nos vetores pAE e pTarget.	30
Figura 2: Mapas dos vetores de expressão construídos no <i>software</i> VectorNTI11.	30
Figura 3: Caracterização enzimática dos vetores recombinantes.	31
Figura 4: Extração dos vetores recombinantes.	32
Figura 5: Purificação de rOmpL37 através de cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sefarose.	33
Figura 6: Caracterização de rOmpL37 através de <i>Western blot</i>	34
Figura 7: Caracterização do soro hiperimune anti-rOmpL37 através de <i>Western blot</i>	34
Figura 8: Imunofluorescência indireta em células CHO-K1 transfectadas com pTarget/ompL37.	35
Figura 9: Análise da presença de <i>ompL37</i> em <i>Leptospira</i> spp.	36

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Microbiologia e genômica.....	14
2.2 Ciclo de transmissão e epidemiologia.....	15
2.3 Mecanismos de patogênese.....	16
2.4 Manifestações clínicas.....	18
2.5 Imunidade e vacinas.....	19
2.6 Controle, diagnóstico e tratamento.....	20
2.7 OmpL37.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Cepas e condições de cultivo.....	24
4.2 Desenho dos primers e amplificação do gene <i>ompL37</i> por PCR.....	24
4.3 Análise da presença do gene <i>ompL37</i> em <i>Leptospira</i> spp.....	25
4.4 Clonagem de <i>ompL37</i> nos vetores pAE e pTarget.....	25
4.5 Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação.....	26
4.6 Seleção e confirmação de clones recombinantes.....	26
4.7 Extração dos vetores recombinantes.....	26
4.8 Expressão heteróloga de rOmpL37.....	27
4.9 Purificação de rOmpL37.....	27

4.10 Caracterização de rOmpL37 através de <i>Western blot</i>	28
4.11 Produção de soro hiperimune anti-OmpL37.....	28
4.12 Ensaio de transfecção com pTarget/ <i>ompL37</i>	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Amplificação de <i>ompL37</i> e clonagem nos vetores pAE e pTarget.....	30
5.2 Caracterização e extração dos vetores recombinantes.....	31
5.3 Obtenção da proteína recombinante rOmpL37.....	32
5.4 Caracterização de rOmpL37 por <i>Western blot</i>	33
5.5 Caracterização do soro hiperimune anti-OmpL37.....	34
5.6 Ensaio de transfecção em linhagem de células CHO-K1.....	35
5.7 Análise da presença de <i>ompL37</i> em <i>Leptospira</i> spp.....	35
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÕES.....	38
8. REFERÊNCIAS.....	39

1. Introdução

A leptospirose é uma doença infecciosa de importância global causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira*, que afeta humanos e animais domésticos e silvestres (BHARTI, et al., 2003; VIJAYACHARI, et al., 2008). Estima-se a ocorrência de cerca de 500.000 casos de leptospirose por ano em todo o mundo (WHO, 2003) e, em 5 a 15% das infecções clínicas, a doença progride para quadros graves, caracterizados por falência renal, icterícia e hemorragia pulmonar, podendo atingir até 70% de mortalidade (LEVETT, 2001; KO, et al., 2009). A infecção é contraída por contato direto ou indireto com urina de animais portadores (principalmente roedores), via solo, água ou alimentos contaminados e, geralmente, está relacionada com a falta de saneamento básico, superpopulação, atividades recreativas e ocupacionais (PLANK; DEAN, 2000; EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Até o momento já foram descritas 20 espécies de *Leptospira* e mais de 260 sorovares patogênicos, sendo o lipopolissacarídeo (LPS) um fator determinante para esta diversidade antigênica e sorológica (VIJAYACHARI, et al., 2008). As vacinas comercialmente disponíveis são bacterinas, que geram resposta protetora apenas contra os sorovares que constituem a vacina, ou seja, não fornecem uma proteção de amplo espectro contra a leptospirose. Além disso, essas vacinas geram uma imunidade de curta duração, requerendo reforços semestrais ou anuais, e apresentam uma alta reatogenicidade, sendo permitido o uso em humanos apenas em poucos países, como China, Cuba, Japão e França (FAINE, et al., 1999; DELLAGOSTIN, et al., 2011).

Estudos para o desenvolvimento de uma vacina de amplo espectro tem sido amparados por ferramentas de genômica, proteômica e bioinformática disponíveis, e focam, principalmente, em fatores de virulência e de motilidade da *Leptospira* spp., LPS e OMPs (NASCIMENTO, et al., 2004; WANG, et al., 2007; ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Assim, novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, bem como diferentes formas de apresentação desses antígenos ao sistema imune tem sido exploradas.

Vacinas de subunidade e de DNA são tipos de vacinas recombinantes e possíveis alternativas para o controle da leptospirose. As vacinas de subunidade são licenciadas pelos órgãos de regulamentação competentes e tem o potencial de

conferir proteção sem o risco de causar a doença, enquanto que vacinas de DNA além de também possuírem essa vantagem, são de fácil obtenção e manuseio, baixo custo e podem induzir tanto resposta imune humoral quanto celular, uma vez que o antígeno recombinante é expresso na própria célula eucariótica (WANG, et al., 2007). Diversos antígenos leptospirais, até então considerados os mais promissores para compor uma vacina (LipL32, LipL41, LigA, LigB e Loa22), já foram testados através de diferentes estratégias e com diferentes adjuvantes, porém nenhum destes antígenos conferiu proteção total, estatisticamente significativa e esterilizante (DELLAGOSTIN, et al., 2011).

L. interrogans, espécie responsável pelo maior número de casos de leptospirose humana, possui 627 genes únicos – não compartilhados com outras espécies – e desses, cerca de 80% codificam para proteínas hipotéticas (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Esses dados demonstram que *Leptospira* spp. possui fatores de virulência únicos, que determinam mecanismos de patogenicidade não conhecidos em outras bactérias (NASCIMENTO, et al., 2004; ADLER, et al., 2011). A caracterização *in vitro* e *in vivo* de algumas dessas proteínas pode representar a identificação de potenciais alvos vacinais.

A proteína OmpL37 é conservada entre diversos sorovares patogênicos de *Leptospira* spp., é reconhecida pelo soro de pacientes na fase convalescente e possui propriedades de ligação a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, como fibronectina, fibrinogênio, laminina e elastina (PINNE, et al., 2010). Até então, havia sido descrito que apenas os domínios repetitivos conservados das proteínas LigB e LigA (LigBrep) apresentavam capacidade de ligação à elastina (LIN, et al., 2009). Isso sugere a participação de OmpL37 na patogênese da leptospirose, especialmente no que se refere à adesão aos tecidos ricos em elastina, como paredes de vasos sanguíneos e pulmonares, podendo ter forte envolvimento com as complicações hemorrágicas da doença (DOLHNIKOFF, et al., 2007).

Neste trabalho, nós clonamos o gene *ompL37* em dois vetores, sendo um para expressão em procaríoto (pAE) e outro para expressão em células mamíferas (pTarget). Dessa forma, pretendemos obter uma vacina de subunidade recombinante e uma vacina de DNA, utilizando o antígeno OmpL37, que serão futuramente testadas quanto ao seu potencial imunoprotetor em modelo animal.

2. Revisão de literatura

2.1 Microbiologia e genômica

Leptospiras são bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales (BHARTI, et al., 2003). O gênero *Leptospira* compreende 20 espécies, sendo 13 patogênicas, classificadas em mais de 260 sorovares (KO, et al., 2009). Essa classificação sorológica é determinada, principalmente, pela diversidade antigênica do lipopolissacarídeo (LPS) presente em sua membrana externa. Sorovares contendo determinantes antigênicos relacionados são agrupados no mesmo sorogrupo (LEVETT, 2001; BHARTI, et al., 2003).

O genoma compreende dois cromossomos, CI e CII, com 4,3 Mb e 350 kb, respectivamente. A saprófita *L. biflexa* possui, ainda, um terceiro *replicon*, p74, que parece conter genes indispensáveis à sua sobrevivência. Não há descrição de plasmídeos ou mecanismos de transferência gênica (ZUERNER, et al., 1993; NASCIMENTO, et al., 2004; MCBRIDE, et al., 2005; PICARDEAU, et al., 2008).

A comparação genômica de duas espécies patogênicas e uma saprófita identificou a presença de 2.052 genes compartilhados, identificando o *core* do genoma leptospiral. Mais de 50% dos genes de *Leptospira* spp. são de função desconhecida, sugerindo a presença de fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade únicos (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Existem poucas ferramentas genéticas disponíveis para mutagênese em leptospiras, principalmente nas cepas patogênicas. Entretanto, diversos mutantes já foram obtidos através de mutagênese randômica (BOURHY, et al., 2005; RISTOW, et al., 2007; MURRAY, et al., 2009; MURRAY, et al., 2009; MURRAY, et al., 2009; MURRAY, et al., 2010; LAMBERT, et al., 2012), recombinação homóloga sítio-dirigida (PICARDEAU, et al., 2001; CRODA, et al., 2008) e utilização do vetor *shuttle E. coli-L. biflexa* (GIRONS, et al., 2000; FIGUEIRA, et al., 2011).

A elevada motilidade dessas bactérias, assim como em outras espiroquetas, é decorrente da atividade de dois flagelos periplasmáticos, que se estendem no espaço entre a membrana interna e a membrana externa (KO, et al., 2009). Cada flagelo está ancorado numa extremidade, sendo responsáveis pelo formato de gancho único das leptospiras (CHARON; GOLDSTEIN, 2002; LAMBERT, et al.,

2012; RADDI, et al., 2012). Seu formato helicoidal, por outro lado, não está relacionado com a estrutura flagelar (PICARDEAU, et al., 2001).

As leptospiras são aeróbias obrigatórias, com temperatura ótima de crescimento de 30 °C e medem cerca de 6-25 µm de comprimento e aproximadamente 0,2 µm de diâmetro, sendo sensíveis aos antibióticos beta-lactâmicos e tetraciclina (BHARTI, et al., 2003; EVANGELISTA; COBURN, 2010). O meio de cultura utilizado para o seu crescimento, Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) é baseado em ácido oleico, albumina sérica bovina e polisorbato 80, geralmente suplementado com soro de coelho ou suplementos comerciais (LEVETT, 2001). Por outro lado, algumas cepas de *Leptospira* spp. são capazes de sobreviver em ambientes com baixa concentração de nutrientes, o que tem sido atribuído à capacidade de formação de biofilme e à interação com bactérias ambientais (RISTOW, et al., 2008; BARRAGAN, et al., 2011).

A estrutura de dupla membrana agrega características de bactérias Gram-negativas, porém com a camada de peptidoglicano ancorada à membrana interna, típico de bactérias Gram-positivas (VIJAYACHARI, et al., 2008). A membrana externa apresenta LPS e diversas lipoproteínas, as quais tem sido consideradas potenciais alvos vacinais (HAAKE; MATSUNAGA, 2010; DELLAGOSTIN, et al., 2011).

Através de técnicas sofisticadas de proteômica, Malmström *et al.* (2009) determinaram o número de cópias de proteínas por célula, demonstrando que as lipoproteínas são as proteínas mais abundantes na célula leptospiral. A relação das lipoproteínas em maior quantidade na célula são: LipL32 > Loa22 > LipL41 (MALMSTROM, et al., 2009). Diversas outras OMPs já foram identificadas, como: OmpL1, LipL45, LipL21, LipL48, OmpL37 e proteínas Ligs (*leptospiral immunoglobulin-like*) (CULLEN, et al., 2004; CULLEN, et al., 2005).

2.2 Ciclo de transmissão e epidemiologia

O ciclo de transmissão da leptospirose envolve um animal reservatório do patógeno, uma fonte de infecção e um hospedeiro suscetível, podendo este ser humano, caracterizando, portanto, uma zoonose. Roedores são portadores

assintomáticos da doença e também os principais carreadores da espiroqueta, porém, esse caráter de portador crônico já foi reportado em quase todos os mamíferos. O humano, entretanto, não é importante na transmissão da leptospirose (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

As leptospiras são albergadas nos túbulos renais proximais dos animais carreadores, domésticos ou silvestres, e excretadas na urina, contaminando solo, água e alimentos. A infecção é contraída via mucosas ou abrasões na pele, através do contato direto com a urina/material biológico do animal infectado ou indireto, através do contato com o ambiente contaminado (HARTSKEERL, et al., 2011).

Estima-se a ocorrência de aproximadamente 500 mil novos casos de leptospirose ao ano (WHO, 2003). Porém, acredita-se que esse número é subestimado em função da precariedade da vigilância sanitária em alguns países, do difícil diagnóstico e dos sintomas pouco específicos na fase inicial da doença (HOTEZ, et al., 2008; ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Em países desenvolvidos, a ocorrência da doença está associada a atividades ocupacionais, tais como medicina veterinária, mineração e pecuária; e recreativas, como esportes aquáticos. Já nos países em desenvolvimento, a leptospirose é relacionada com as condições precárias de higiene, com a falta de saneamento básico e com o superpovoamento (REIS, et al., 2008). Em regiões de clima tropical ou subtropical, a incidência de leptospirose é maior, com ocorrência de surtos, principalmente em períodos de chuva e enchentes, já que essas condições favorecem a disseminação das leptospiras e provocam uma maior exposição à bactéria (VINETZ, 2001; BHARTI, et al., 2003).

2.3 Mecanismos de patogênese

Na fase inicial da doença, após a entrada das leptospiras no hospedeiro, essas bactérias multiplicam-se rapidamente no sangue (leptospiremia) e migram pelos tecidos até atingirem órgãos-alvo, como rins, pulmões e fígado. Apesar de não serem microrganismos intracelulares, são capazes de atravessar e residir transientemente no interior de células, como demonstrado *in vitro*, o que parece ser importante para evasão do sistema imune e rápida colonização de órgãos do

hospedeiro (BAROCCHI, et al., 2002; KO, et al., 2009). Proteínas de membrana externa com afinidade por componentes da matriz extracelular do hospedeiro também são importantes na invasão e na disseminação da bactéria no organismo (CULLEN, et al., 2005; HAAKE; MATSUNAGA, 2010).

Um mecanismo fundamental para a patogênese da doença é a motilidade. A capacidade de deslocamento em meios altamente viscosos e a localização interna do flagelo periplasmático, que além de permitir a proteção contra variações extremas de condições externas, como pH e concentrações de sal, também previne a imobilização da bactéria via anticorpos anti-flagelares, são características evolutivamente vantajosas para a espiroqueta (GOLDSTEIN; CHARON, 1988; CHARON; GOLDSTEIN, 2002). Estudos de mutagênese mostraram que as proteínas FlaA e FliY que compõem o flagelo são essenciais para a virulência das leptospiros, e FlaB, essencial para motilidade (PICARDEAU, et al., 2001; LIAO, et al., 2009; LAMBERT, et al., 2012).

Alguns outros mutantes construídos também resultaram em atenuação da virulência, ou seja, sem capacidade de causar doença em modelo animal suscetível. Os fatores de virulência já identificados em *Leptospira* spp. são Loa22 (RISTOW, et al., 2007), HemO (MURRAY, et al., 2009), LPS (MURRAY, et al., 2010), FlaA (LAMBERT, et al., 2012) e FliY (LIAO, et al., 2009), indicando a participação dos mesmos na patogênese da *Leptospira* spp.

Leptospiros patogênicos são capazes de escapar dos mecanismos imunes de defesa do hospedeiro, principalmente no que se refere às estratégias de migração para sítios imunoprivilegiados, como rins e olhos, e evasão do sistema complemento (FRAGA, et al., 2011). A resistência ao soro ocorre em função da habilidade de ligar reguladores negativos da via alternativa e das vias clássica e lectina, como fator H (FH) e proteína ligadora de C4b (C4BP), respectivamente (MERI, et al., 2005; BARBOSA, et al., 2009; CASTIBLANCO-VALENCIA, et al., 2012). A interação desses reguladores com as proteínas Ligs de *Leptospira* spp. já foi demonstrada, indicando outra importante função dessas proteínas (CASTIBLANCO-VALENCIA, et al., 2012).

2.4 Manifestações clínicas

A apresentação clínica da leptospirose é bifásica, com uma fase aguda caracterizada por septicemia na primeira semana da infecção, seguida de uma fase imune, marcada pela disseminação das bactérias para órgãos-alvo, produção de anticorpos e excreção de leptospiras na urina (KO, et al., 2009). Os sintomas podem variar de uma forma leve ou anictérica até uma forma grave ou ictérica com complicações multissistêmicas, dependendo de vários fatores como: dose infectante, imunidade do hospedeiro e o sorovar em questão (LEVETT, 2001).

Inicialmente, os sintomas são pouco específicos, como febre, mialgia e dores de cabeça, podendo ser facilmente confundidos com outras doenças, tais como gripe, dengue e febre amarela. Somado a isso, são poucos os laboratórios aptos a identificar a doença utilizando a técnica padrão de diagnóstico, o teste de microaglutinação (MAT). Dessa forma, o número de casos é subestimado e a doença acaba sendo negligenciada (WHO, 2003; HOTEZ, et al., 2008).

A forma ictérica da leptospirose ocorre em 5-10% dos casos e pode ser dividida em 3 categorias: síndrome de Weil, caracterizada por icterícia, uveíte, falência renal, hemorragia e miocardite; meningite/meningoencefalite; e síndrome hemorrágica pulmonar associada à leptospirose, com falência respiratória. A taxa de mortalidade das formas graves da doença pode ultrapassar 50% (MCBRIDE, et al., 2005; RICALDI; VINETZ, 2006; GOUVEIA, et al., 2008).

Em animais, a leptospirose pode resultar em distúrbios reprodutivos (retenção de placenta, abortos e natimortos), alterações congênitas, ou infecções inaparentes capazes de levá-los à subfertilidade, causando perdas produtivas e reprodutivas no animal (LILENBAUM; DOS SANTOS, 1995). Sendo assim, a indústria agropecuária sofre grande impacto econômico, com prejuízos para os produtores e, conseqüentemente, para a economia dos países em questão. Existem sorovares adaptados a algumas espécies de animais acometidos, como Canicola em cães, Bratislava em equinos e suínos e Hardjo em bovinos, porém, essas associações não são obrigatórias e definitivas, e as bases moleculares que as determinam ainda não são bem entendidas (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

2.5 Imunidade e vacinas

As leptospirosas são inicialmente detectadas pelo sistema imune do hospedeiro através dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), principalmente o LPS (MOGENSEN, 2009; FRAGA, et al., 2011). O LPS leptospiral ativa macrófagos humanos via receptor *Toll-like 2* (TLR2), diferentemente do LPS de Gram-negativas que atua a nível de TLR4 (WERTS, et al., 2001).

A ativação do sistema complemento representa um dos principais mecanismos de defesa do sistema imune inato para o reconhecimento e eliminação das leptospirosas do organismo, o que pode ser evidenciado pela morte, em poucos minutos, de *L. biflexa* na presença de soro humano normal (MERI, et al., 2005). O papel da resposta imune adquirida, humoral e celular, na leptospirose está relacionado com a produção de anticorpos aglutinantes e opsonizantes, com o recrutamento de células do sistema imune, através da produção de citocinas inflamatórias e, possivelmente, com a proteção contra uma reinfecção (GANOZA, et al., 2010; FRAGA, et al., 2011).

Alguns quadros clínicos, como uveíte e hemorragia pulmonar, ocorrem, em parte, por complicações autoimunes devido à grande inflamação local. Anticorpos contra as proteínas LruA e LruB de *Leptospira* spp. também reconhecem proteínas dos olhos de equinos, reforçando a hipótese de autoimunidade (VERMA, et al., 2010).

A maior parte dos anticorpos produzidos durante a infecção é contra o LPS (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Imunizações com o LPS, seja ativa ou passivamente (anticorpos anti-LPS), são protetoras contra a doença (JOST, et al., 1986; MIDWINTER, et al., 1990; SRIKRAM, et al., 2011). A resposta imune celular ainda é pouco entendida, mas está envolvida na proteção contra leptospirose em bovinos, com proliferação de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ e produção de interferon- γ (NAIMAN, et al., 2001; NAIMAN, et al., 2002).

As vacinas atualmente disponíveis induzem uma resposta imune humoral predominantemente contra o LPS, sem gerar resposta dependente de células T, sendo necessários reforços anuais. Além disso, fornecem proteção apenas contra os

sorovares que compõem a vacina e são altamente reatogênicas em humanos (FAINE, et al., 1999; DELLAGOSTIN, et al., 2011).

Devido a essas limitações, diversos estudos tem focado no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose. As proteínas LipL41 e OmpL1 demonstraram proteção parcial quando co-administradas em hamsters (HAAKE, et al., 1999). A lipoproteína de membrana externa LipL32, a proteína mais abundante na bactéria, já foi apresentada ao sistema imune via adenovírus (BRANGER, et al., 2001) e BCG recombinante (SEIXAS, et al., 2007), e na forma de vacina de DNA (BRANGER, et al., 2005) e vacina de subunidade (SEIXAS, et al., 2007; GRASSMANN, et al., 2012), porém todas as estratégias apresentaram baixa eficácia. O potencial imunoprotetor de formulações vacinais com as proteínas Ligs combinadas a diferentes adjuvantes também já foi avaliado, apresentando os resultados mais promissores encontrados até então (DELLAGOSTIN, et al., 2011).

A proteína LigA conferiu proteção esterilizante quando fusionada à glutationa-S-transferase e administrada com hidróxido de alumínio, porém esta não foi significativa (PALANIAPPAN, et al., 2006). A porção C-terminal desta proteína (LigAni) protegeu 67-100% dos hamsters de desafio letal com *Leptospira interrogans*, utilizando adjuvante de Freund, porém não conferiu imunidade esterilizante (SILVA, et al., 2007). Como vacina de DNA, este antígeno também foi protetor, mas novamente sem significância estatística. (FAISAL, et al., 2008).

A estratégia *prime-boost*, baseada em imunizações de DNA e proteína, também já foi descrita em estudos vacinais contra leptospirose com as proteínas LipL32, LipL41 e OmpL1 fusionadas (FENG, et al., 2009). A dose reforço (*boost*) de proteína parece aumentar e fortalecer a imunogenicidade previamente induzida pela vacina de DNA.

2.6 Controle, diagnóstico e tratamento

O controle da leptospirose consiste basicamente em interromper a transmissão através da identificação da fonte e melhorar as condições de higiene da população, bem como em vacinar as espécies acometidas pela doença. A primeira medida é extremamente difícil de ser implementada tendo em vista o grande número

de animais reservatórios da bactéria e a extensa população de roedores, principalmente em países em desenvolvimento de regiões tropicais ou subtropicais, onde as condições básicas de higiene e saneamento são precárias e o clima favorece a ocorrência de surtos (LEVETT, 2001; WHO, 2003).

Como alternativa para o controle da doença, tem-se as bacterinas, vacinas atualmente disponíveis contra leptospirose. Porém, estas vacinas são sorovares-específicas, sendo necessários estudos epidemiológicos contínuos para que se tenha conhecimento dos sorovares prevalentes numa determinada região e assim incluí-los da preparação da vacina. Além disso, esse tipo de vacina não é indicado para humanos em razão da sua elevada reatogenicidade, justificando o estudo para o desenvolvimento de novas vacinas visando o controle desta zoonose (FAINE, et al., 1999; DELLAGOSTIN, et al., 2011).

O diagnóstico clínico da doença é dificultado pelas variadas e inespecíficas formas de apresentação dos sintomas. O MAT é considerado padrão-ouro para diagnosticar a leptospirose. Contudo, este teste possui algumas desvantagens, como por exemplo, a necessidade de amostras de soro pareadas a fim de demonstrar a soroconversão no decorrer da doença, bem como de uma bateria de sorovares de referência a serem usados nas reações de aglutinação (WHO, 2003; MCBRIDE, et al., 2005).

Outras técnicas utilizadas no diagnóstico laboratorial da leptospirose incluem: microscopia de campo escuro, imunofluorescência, ELISA, cultura e PCR. Porém, estes métodos também apresentam uma série de problemas, como baixa sensibilidade, visualização das leptospiras apenas no estágio inicial da doença, muito tempo para realização e obtenção do resultado e ineficiência em detectar o sorovar infectante (AHMAD, et al., 2005; MCBRIDE, et al., 2005). Alguns antígenos recombinantes de *Leptospira* spp. já foram avaliados quanto sua utilidade no sorodiagnóstico da leptospirose (FLANNERY, et al., 2001).

O tratamento se dá através da administração de antibióticos. Casos graves da doença são tratados com penicilina intravenosa, enquanto que manifestações clínicas mais leves podem ser tratadas com antibióticos orais como amoxicilina, ampilina, doxiciclina ou eritromicina. Leptospiras são sensíveis a um grande

espectro de antimicrobianos *in vitro*, porém, poucos tem sido avaliados em triagens clínicas *in vivo* (BHARTI, et al., 2003; WHO, 2003).

2.7 OmpL37

OmpL37 é uma proteína de membrana externa de 37 kDa conservada entre diferentes sorovares patogênicos da bactéria. Por ser reconhecida pelo soro de humanos e animais infectados, demonstra ser antigênica e de fácil acesso ao sistema imune. Além disso, alguns ensaios *in vitro* avaliaram sua capacidade de ligação aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro, demonstrando afinidade ao fibrinogênio, fibronectina e elastina (PINNE; HAAKE, 2009; PINNE, et al., 2010).

Recentemente, foi mostrado que OmpL37 é expressa em maior quantidade *in vivo* do que *in vitro*, em modelo de hamster e camundongo (MATSUI, et al., 2012). Essas características são desejáveis em um antígeno vacinal protetor contra leptospirose, e já mostraram ser importantes em diversos estudos com outras proteínas que compartilham essas propriedades, como LipL32, LipL41, LigAni, LigB (HAAKE, et al., 1999; BRANGER, et al., 2001; BRANGER, et al., 2005; SEIXAS, et al., 2007; SILVA, et al., 2007).

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi obter e caracterizar um antígeno vacinal com potencial de conferir proteção de amplo espectro contra leptospirose, visando sua utilização como vacina tanto na forma de subunidade quanto na forma de DNA.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar o gene *ompL37* no vetor pAE e no vetor pTargetT;
- Produzir a proteína recombinante rOmpL37 em *Escherichia coli* e caracterizá-la através de *Western blot*;
- Produzir soro hiperimune contra rOmpL37 e caracterizá-lo através de ELISA e *Western blot*;
- Transfectar células mamíferas com o vetor pTargetT/*ompL37* construída e caracterizá-la através de imunofluorescência e *Western blot*;
- Avaliar a conservação do gene *ompL37* em diferentes espécies e sorovares de *Leptospira* patogênica.

4. Metodologia

4.1 Cepas e condições de cultivo

L. interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi crescida em meio EMJH (Difco) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) à 30 °C. Foram realizados repiques semanais, acompanhados de contagem das células bacterianas em câmara de Petroff-Hausser, sendo que 10^8 células foram utilizadas para extração de DNA genômico, com o *kit* comercial *Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), para utilização como DNA molde na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As cepas utilizadas para clonagem e expressão foram *E. coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen) e *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Estas cepas foram cultivadas a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 1,5% agar) sob agitação de 200 rpm ou acrescido de 1,5% de ágar e, quando necessário, suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina.

4.2 Desenho dos *primers* e amplificação do gene *ompL37* por PCR

Os *primers* para a amplificação do gene *ompL37* foram desenhados a partir de sequências depositadas no GenBank, com o auxílio do *software* VectorNTI 11 (Invitrogen). Para clonagem do gene *ompL37* no vetor de expressão pAE, foram utilizados os seguintes *primers*: For_pA_ompL37: 5' AAGGATCCGATCAGATCAACTTAG 3' e Rev_ompL37: 5' TGGGTACCTTAATTTTGTGTTTTT 3'. Para clonar o mesmo gene no vetor de expressão em células mamíferas, pTarget, foi utilizado o mesmo *primer* reverso descrito anteriormente e o seguinte *primer* forward: For_pT_ompL37: 5' ACCATGGGAGATCAGATCAACTTAG 3'. Os *primers* For_pA_ompL37 e Rev_ompL37 possuem sítio para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I, respectivamente, enquanto que ao *primer* For_pT_ompL37 foi adicionada a sequência de Kozak, que tem papel na iniciação da tradução em eucariotos (nucleotídeos destacados em sublinhado).

A sequência codificadora do gene *ompL37* foi amplificada pela técnica de PCR utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (*kit GoTaq Colores Master Mix - ProMega*), num volume final de 25 μl de reação. As reações de PCR foram

realizadas usando 35 ciclos de desnaturação (95 °C), anelamento (52 °C) e extensão (72 °C). Os produtos da reação de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados da solução usando *GFX PCR and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

4.3 Análise da presença do gene *ompL37* em *Leptospira* spp.

A presença de *ompL37* entre *Leptospira* spp. foi analisada através de PCR usando como molde o DNA genômico de 18 sorovares: *L. interrogans* sorovares Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Djasiman, Hebdomadis e Muenchen; *L. borgpetersenii* sorovares Ballum, Castellonis, Mini, Poi, Sejroe e Javanica; *L. kirshneri* sorovares Grippytyphosa e Cynopteri e *L. santarosai* sorogrupo Pomona. Os primers e parâmetros utilizados foram os mesmos descritos anteriormente para amplificação inicial do gene *ompL37*. A integridade do DNA genômico foi avaliada através da amplificação do gene 16S rDNA. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%.

4.4 Clonagem de *ompL37* nos vetores pAE e pTARGET

O produto de PCR e o vetor de expressão em *E. coli* pAE foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I, à 37 °C durante 2 h. A eficiência dessas reações foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose 1%. O produto de cada digestão foi purificado com *GFX PCR and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). A reação de ligação do inserto ao vetor pAE foi realizada com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) à 4 °C, *overnight*. O fragmento amplificado por PCR também foi clonado no vetor pTarget (*pTarget Mammalian Expression Vector System_Promega*), segundo instruções do fabricante. O produto das reações de ligação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1%.

4.5 Transformação de *E. coli* por eletroporação

Foram utilizados 80 μL de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 e 1 μL dos produtos das reações de ligação para o processo de transformação, o qual foi realizado por eletroporação (25 μF de capacitância, 200 ohms de resistência e 2.5 kV). Após a transformação, as células foram cultivadas em placa de LB sólido suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina.

4.6 Seleção e confirmação dos clones recombinantes

Foram selecionadas colônias bacterianas isoladas que cresceram em LB sólido, submetendo-as a um processo de triagem por extração rápida de DNA com fenol-clorofórmio, pelo método microprep (JOUGLARD, 2002). Os clones caracterizados como possíveis recombinantes nesta triagem, foram cultivados em meio LB suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina. A partir deste cultivo, foi realizada uma extração de DNA plasmideal com o *kit* comercial *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare).

O DNA resultante desta extração foi submetido à digestão com enzima de restrição e/ou à técnica de PCR, utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente, para confirmar a presença do inserto.

4.7 Extração dos vetores recombinantes

Os clones recombinantes para o plasmídeo pAE/*ompL37* foram cultivados em meio LB suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina. A partir deste cultivo, foi realizada uma extração de DNA plasmideal com o *kit* comercial *GFX Micro Plasmid Prep Kit* (GE Healthcare).

Já o clone transformado com o plasmídeo pTARGET/*ompL37* foi cultivado em 150 mL de LB suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, para propagação do vetor e extração de plasmídeo em larga escala com o *kit* *GenElute HP Plasmid Maxiprep* (Sigma). O resultado das extrações foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1%. Os plasmídeos extraídos foram quantificados por espectrofotometria

utilizando absorvância no comprimento de onda de 260 nm, e a pureza avaliada pela razão entre as absorvâncias obtidas em 260 nm e 280 nm, sendo considerados puros os plasmídeos que apresentaram absorvância $\geq 1,8$.

4.8 Expressão heteróloga de rOmpL37

A cepa de expressão *E. coli* BL21 Star (DE3) foi transformada por choque térmico com o vetor de expressão pAE/*ompL37*. Um clone recombinante foi utilizado para inocular 10 mL de LB contendo $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e cultivado *overnight*. Esta cultura foi utilizada para inocular 500 mL de LB com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, que foi incubado à 37 °C até a fase log de crescimento (DO_{600} entre 0,6 e 0,8), quando então a expressão de rOmpL37 foi induzida com 1 mM de IPTG (isopropiltio- β -D-galactosídeo), durante 3 h. Após este período, a cultura foi fracionada em tubos de 250 mL, centrifugada a $6.000 \times g$ por 15 min à 4° C, e os *pellets* foram armazenados à - 20 °C.

4.9 Purificação de rOmpL37

Os *pellets* foram solubilizados e sonificados em tampão contendo 100 mM de Tris-base, 300 mM de NaCl, 8 M de ureia e 5 mM de Imidazol (pH 8,0). Após centrifugação à $10.000 \times g$ por 30 min, 4 °C, o sobrenadante foi filtrado e a proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel. As alíquotas de rOmpL37 foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% para visualização da pureza da proteína e, posteriormente, dialisadas à 4 °C contra tampão contendo 100 mM de Tris-base e 300 mM de NaCl em concentrações decrescentes de ureia. Por fim, a proteína foi dialisada contra tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,2) *overnight* à 4 °C e armazenada à - 20 °C. A proteína foi quantificada pelo *kit BCA Protein Assay* (PIERCE), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.10 Caracterização de rOmpL37 através de *Western blot*

A caracterização da proteína recombinante foi realizada através de SDS-PAGE 12% seguido de *Western blot* (WB) com anticorpo monoclonal (MAb) anti-6xHis (Sigma) e com soro humano convalescente obtido de pacientes com leptospirose, utilizando como controle positivo da reação a proteína recombinante rLipL32 e como controle negativo albumina sérica bovina (BSA). As proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham Biosciences) durante 1,5 h à 150 V. As membranas foram bloqueadas com leite em pó 5 %, *overnight* à 4 °C, seguido de 3 lavagens com PBS + 0,05% de Tween 20 (PBS-T).

Posteriormente, as membranas foram incubadas durante 1 h à temperatura ambiente com MAb anti-6xHis numa diluição de 1:6000 ou com soro humano convalescente numa diluição de 1:200. Após 3 lavagens com PBS-T, foram adicionados o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição de 1:6000 (contra MAb anti-6xHis) ou o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase na diluição de 1:1000. Após 3 lavagens com PBS-T, as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

4.11 Produção de soro hiperimune anti-OmpL37

Dois camundongos isogênicos BALB/c fêmeas foram inoculados intraperitonealmente com rOmpL37. A dose administrada foi de 50 µg de proteína recombinante, acrescido do volume correspondente de adjuvante de Freund completo (dia 0) ou incompleto (dias 14, 21 e 28.). O intervalo entre as inoculações foi de 14 dias para a 2^a dose, e de 7 dias para as doses seguintes. Amostras de sangue foram coletadas através de punção do plexo venoso retro-ocular nos dias 0, 14, 21 e 28. O soro foi titulado através de ELISA indireto utilizando a proteína rOmpL37 como antígeno, diluições seriadas do soro hiperimune e diluição 1:6000 do conjugado anti-IgG de camundongo (Sigma). Este soro também foi caracterizado através de WB, conforme descrito anteriormente, quanto à sua capacidade de reconhecimento de rOmpL37. O WB foi conduzido com soro anti-rOmpL37 (1:100) e

conjugado anti-IgG de camundongo (Sigma) (1:6000), e revelado com diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂.

4.12 Ensaio de transfecção com pTarget/ompL37

A expressão de pTarget/ompL37 foi avaliada em cultivo *in vitro* de células de origem mamífera. A linhagem celular CHO-K1 foi cultivada sobre lamínulas de microscópio inseridas em placas de cultivo de seis cavidades. Após atingir confluência de 80%, as células foram transfectadas com 2 µg de pTarget/ompL37 complexado ao reagente Nanofect (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Após 24 h de cultivo, as lamínulas foram submetidas à imunofluorescência indireta para visualização da expressão da proteína. Para isso, as células foram tratadas com metanol por 5 min e incubadas por 1 h à 37 °C com soro hiperimune anti-rOmpL37 (1:100), seguidos por reação com anticorpo secundário conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200) por mais 1 h à 37 °C. O DNA das células foi corado com Hoechst 33258. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência em aumento de 400 vezes. Células tratadas apenas com o vetor pTarget foram utilizadas como controle negativo.

5. Resultados

5.1 Amplificação de *ompL37* e clonagem nos vetores pAE e pTargetT

O gene *ompL37* foi eficientemente amplificado por PCR, gerando um fragmento de aproximadamente 957 pb (Fig. 1A). Após digestão do vetor pAE com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I (Fig. 1B), o gene foi clonado no vetor. O processo de clonagem também foi realizado com o vetor pTargetT. Foram gerados os vetores recombinantes pAE/*ompL37* e pTargetT/*ompL37* (Fig. 2).

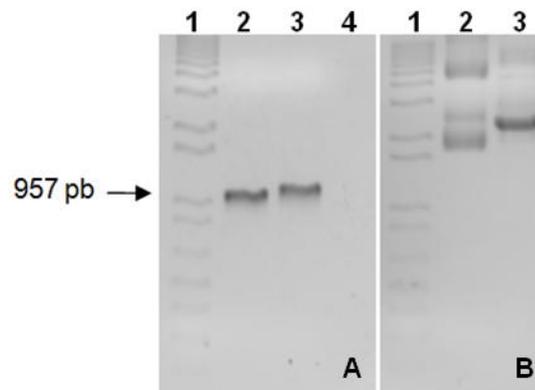


Figura 1. Clonagem do gene *ompL37* nos vetores pAE e pTargetT. A: amplificação de *ompL37* por PCR. (1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen); (2) amplificação de *ompL37* para clonagem no vetor pTargetT; (3) amplificação de *ompL37* para clonagem no vetor pAE; (4) controle negativo da PCR. B: digestão enzimática do vetor pAE. (1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen); (2) vetor pAE não digerido; (3) vetor pAE digerido com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I.

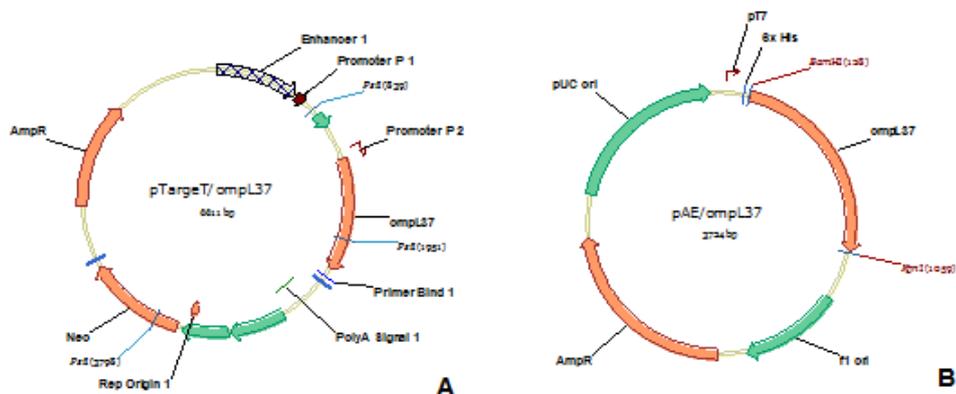


Figura 2. Mapa dos vetores de expressão construídos no *software* VectorNTI11. A: pTargetT/*ompL37*. B: pAE/*ompL37*.

5.2 Caracterização e extração dos vetores recombinantes

A técnica de microprep permitiu a identificação de alguns clones recombinantes para ambos os vetores, através da visualização em gel de agarose de um padrão de banda mais alta do que a do vetor (pAE ou pTargetT) sem inserto, indicando a presença de *ompL37* nessas construções, sendo que esta foi confirmada através da técnica de PCR (dados não mostrados).

A digestão enzimática também foi realizada com o objetivo de confirmar a presença do inserto, bem como, caracterizar a orientação de inserção do gene *ompL37* no pTargetT. Dos possíveis clones recombinantes obtidos para pTargetT/*ompL37*, três tiveram o DNA plasmideal digerido com a enzima *PstI*. Destes, dois apresentaram o padrão de bandas indicando o inserto no sentido horário, segundo o *software* Vector NTI 11, o que é necessário para a funcionalidade do vetor, ou seja, para a expressão da proteína nas células mamíferas (Fig. 3A). A digestão de pAE/*ompL37* com as enzimas *BamHI* e *KpnI* resultou na liberação do inserto no tamanho esperado (957pb), e na linearização do vetor (Fig. 3B).

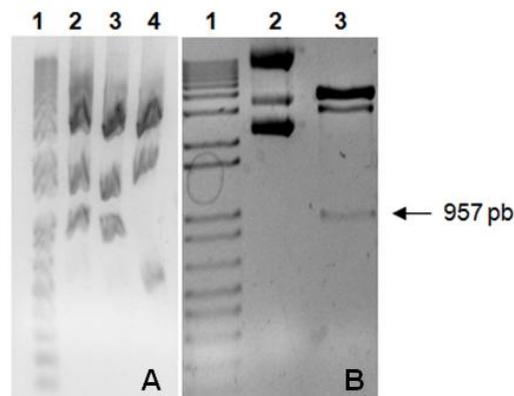


Figura 3. Caracterização enzimática dos vetores recombinantes. A: digestão enzimática do vetor pTargetT/*ompL37* obtido de três diferentes clones com a enzima de restrição *PstI*. (1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen); (2) clone 1 com inserto no sentido horário; (3) clone 2 com inserto no sentido horário; (4) clone 3 com inserto no sentido anti-horário. B: digestão enzimática do vetor pAE/*ompL37*. (1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen); (2) vetor pAE não digerido; (3) vetor pAE/*ompL37* digerido com as enzimas *BamHI* e *KpnI*.

Os vetores recombinantes foram extraídos em quantidade satisfatória, e através de eletroforese em gel de agarose 1%, novamente foi possível visualizar um padrão de banda mais alto para pAE/*ompL37* e pTargetT/*ompL37* quando comparado aos plasmídeos circulares, sem inserto (Fig. 4). A quantificação por

espectrofotometria do vetor pTargeT/*ompL37*, extraído com o *kit GenElute™ HP Plasmid Maxiprep*, permitiu determinar a concentração deste plasmídeo em 420 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

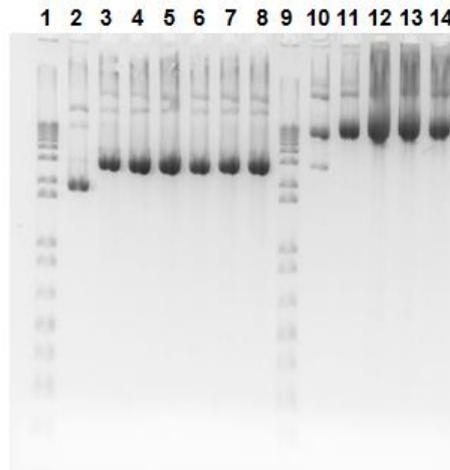


Figura 4. Extração dos vetores recombinantes. (1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder*; (2) vetor pAE circular; (3-8) diferentes eluições de pAE/*ompL37* extraído com o *kit GFX™ Micro Plasmid Prep*; (9) marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder*; (10) vetor pTargeT circularizado; (11-14) diferentes eluições de pTargeT/*ompL37* extraído com o *kit GenElute™ HP Plasmid Maxiprep*.

5.3 Obtenção da proteína recombinante rOmpL37

A proteína rOmpL37 foi expressa na forma insolúvel por *E. coli* BL21 Star™ (DE3) e apresentou o tamanho esperado, de 37 kDa (Fig. 5). O protocolo de solubilização da proteína em ureia foi eficiente e o rendimento obtido foi de 10,4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Após purificação, a proteína foi dialisada contra tampão Tris-NaCl, concentrada em polietilenoglicol (PEG) e estocada à -20°C .

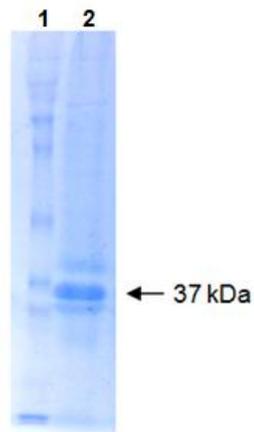


Figura 5. Purificação de rOmpL37 através de cromatografia de afinidade em coluna de sefarose carregada com níquel. (1) Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); (2) rOmpL37 purificada com ureia.

5.4 Caracterização de rOmpL37 por *Western blot*

A proteína rOmpL37 foi caracterizada mediante WB com soro humano convalescente e anticorpo monoclonal (Mab) anti-6xHis. Em ambos os WB, a proteína rOmpL37 foi reconhecida no tamanho esperado de 37 kDa, porém com algum indício de degradação, facilmente visualizado no WB com o anticorpo anti-6xHis (Fig. 6A). A proteína rLipL32 utilizada como controle positivo foi reconhecida nas duas reações, enquanto que o controle negativo (BSA) não foi reconhecido por nenhum anticorpo. Estes resultados sugerem que a solubilização de rOmpL37 e a fusão da mesma à cauda de histidina não alterou significativamente sua conformação, permitindo seu reconhecimento por soro de humanos com leptospirose na fase convalescente (Fig. 6B).

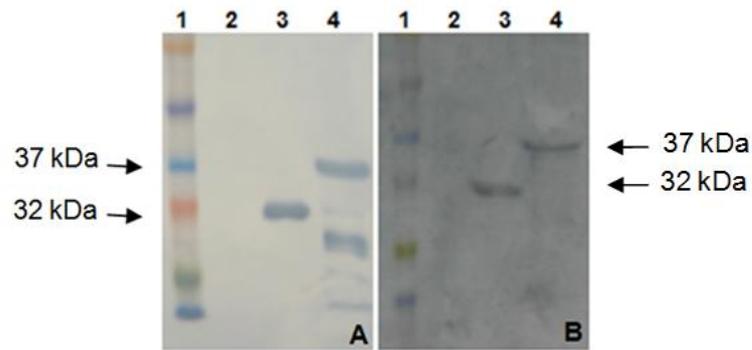


Figura 6. Caracterização de rOmpL37 através de *Western blot*. A: WB com anticorpo anti-6xHis. (1) Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); (2) BSA usada como controle negativo; (3) rLipL32 (32 kDa) usada como controle positivo; (4) rOmpL37 (37 kDa). B: WB com soro humano convalescente. (1) Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); (2) BSA usada como controle negativo; (3) rLipL32 usada como controle positivo; (4) rOmpL37.

5.5 Caracterização do soro hiperimune anti-OmpL37

O soro produzido contra rOmpL37 foi caracterizado através de ELISA, apresentando título superior à 1:25.600. Os anticorpos também foram capazes de reconhecer a proteína recombinante no WB, na altura de 37 kDa, porém, com algum indício de degradação e de contaminação com outras proteínas (Fig. 7). Além disso, o soro também reconheceu a proteína OmpL37 em sua forma nativa, em extrato de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 (dados não mostrados).

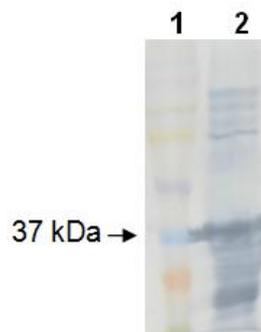


Figura 7. Caracterização do soro hiperimune anti-OmpL37 através de *Western blot*. (1) Marcador de massa molecular *Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker* (GE Healthcare); (2) rOmpL37.

5.6 Ensaio de transfecção em linhagem de células CHO-K1

Os procedimentos para a transfecção da linhagem celular CHO-K1 com pTargetT/ompL37 foram realizados com sucesso. Através de imunofluorescência com o soro hiperimune anti-OmpL37, foi possível confirmar a expressão da proteína nas células mamíferas conforme o esperado (Fig. 8), indicando a funcionalidade desta construção e possibilitando seu uso como vacina de DNA contra leptospirose. As células transfectadas apenas com o vetor pTargetT não apresentaram fluorescência.

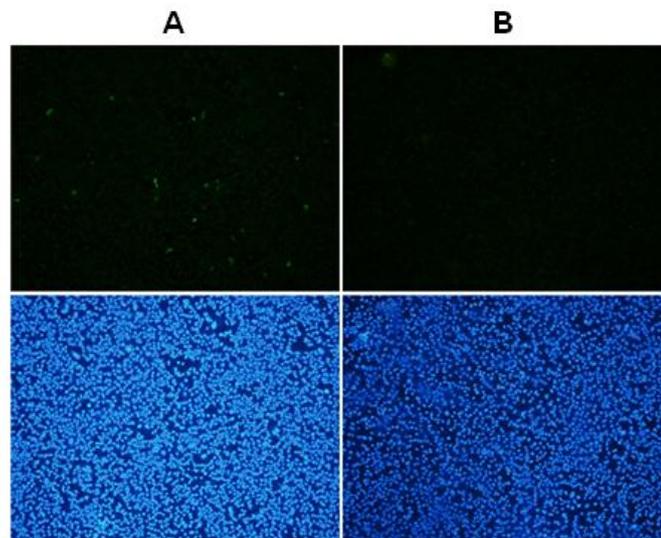


Figura 8. Imunofluorescência indireta em células CHO-K1 transfectadas com pTargetT/*ompL37*. A: Células transfectadas com pTargetT/*ompL37*. B: Células transfectadas apenas com o vetor pTargetT. As imagens superiores representam a fluorescência de FITC, enquanto as imagens inferiores representam a fluorescência do Hoechst 33258.

5.7 Análise da presença de *ompL37* em *Leptospira* spp.

Através da técnica de PCR, foi possível detectar a presença de *ompL37* em todos os 18 sorovares testados, no tamanho esperado, de 957 pb (Fig. 7A). A amplificação do gene *16s rDNA* confirmou a integridade do DNA utilizado na técnica de PCR (Fig. 7B).

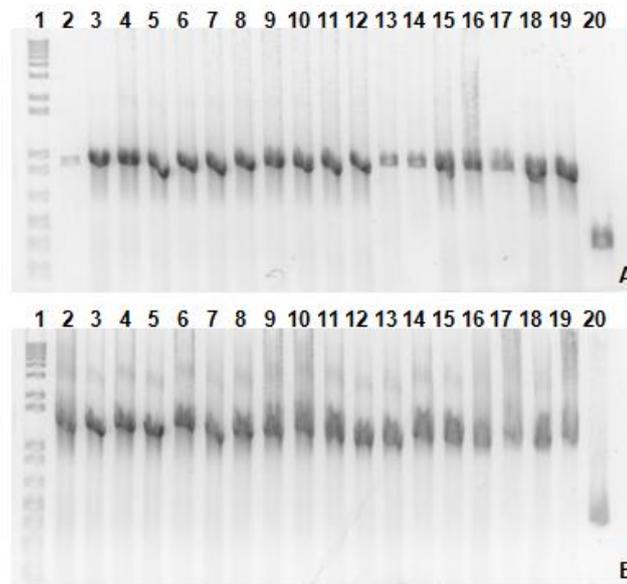


Figura 9. Análise da presença de *ompL37* em *Leptospira* spp. A: amplificação do gene *ompL37*. B: amplificação do gene *16s rDNA*. (1) Marcador de peso molecular *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen). (3) *L. interrogans* sorovares Pomona, (7) Canicola, (12) Icterohaemorrhagiae, (14) Autumnalis, (15) Bataviae, (16) Bratislava, (17) Djasiman, (18) Hebdomadis e (19) Muenchen; (13) *L. borgpetersenii* sorovares Ballum, (9) Castellonis, (10) Mini, (11) Poi, (5) Sejroe e (2) Javanica; (4) *L. kirshneri* sorovares Grippytyphosa e (6) Cynopteri e (8) *L. santarosai* sorogrupo Pomona. (20) Controle positivo da reação de PCR (*lipL32*).

6. Discussão

O desenvolvimento de novas vacinas contra leptospirose, seguras e capazes de induzir proteção cruzada contra diferentes sorovares da bactéria, representando uma alternativa às bacterinas existentes, ainda permanece um desafio (KO, et al., 2009; ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Proteínas de membrana externa com atividade de adesinas são antígenos promissores para compor uma vacina eficaz e protetora, pois são facilmente reconhecidas pelo sistema imune e desempenham um papel importante na patogênese desta doença (CULLEN, et al., 2004; HAAKE; MATSUNAGA, 2010). O presente estudo aborda a construção e a caracterização de duas vacinas recombinantes para serem utilizadas como vacina de subunidade e vacina de DNA contra leptospirose, utilizando o antígeno OmpL37.

Estudos anteriores elucidaram a importância da resposta imune celular, e não apenas da humoral, no combate à infecção por *Leptospira* spp. patogênicas

(NAIMAN, et al., 2002; ZUERNER, et al., 2011). Diferentes estratégias e formulações vacinais tem sido estudadas buscando uma modulação imune adequada e protetora (DELLAGOSTIN, et al., 2011). Vacinas de DNA permitem a expressão prolongada do antígeno na própria célula eucariótica, induzindo imunidade humoral e celular (WANG, et al., 2007). Diversos antígenos leptospirais, como LigA, OmpL1, LipL32 e LipL21 foram avaliados nesta forma, conferindo proteção parcial contra a doença. Da mesma forma, estes antígenos já foram testados como vacina de subunidade recombinante, conjugados a diferentes adjuvantes ou veículos de entrega, também demonstrando potencial protetor parcial (DELLAGOSTIN, et al., 2011). A combinação dessas duas estratégias de estimulação do sistema imune (*prime-boost*) configura uma alternativa promissora para o controle da leptospirose (FENG, et al., 2009).

O sistema de expressão heteróloga adotado neste estudo foi eficiente, resultando na obtenção de rOmpL37 na forma insolúvel e com um rendimento de $10,4 \text{ mg.L}^{-1}$, em concordância com o que foi obtido para rLigAni (SILVA, et al., 2007) e rLTB::LipL32 (GRASSMANN, et al., 2012). Por outro lado, Seixas *et al* (2007) reportou a produção de rLipL32 com um rendimento consideravelmente maior, de 40 mg.L^{-1} , o que pode ter ocorrido em função da mesma ser expressa na forma solúvel, não sendo necessárias as etapas de solubilização que podem acarretar na perda da proteína. Uma alternativa que poderia possibilitar a obtenção de uma maior quantidade de rOmpL37, bem como permitiria sua expressão na forma solúvel, evitando erros conformacionais, seria a utilização da levedura *Pichia pastoris* como plataforma de expressão, uma metodologia já descrita com sucesso pelo nosso grupo (HARTWIG, et al., 2010). A reação de rOmpL37 com soro humano demonstrou que esta proteína manteve epitopos antigênicos presentes em sua forma nativa, indicando que o processo de expressão e purificação provavelmente não alterou substancialmente sua conformação, e confirmando a expressão desta proteína durante a infecção do hospedeiro (PINNE, et al., 2010; MATSUI, et al., 2012).

O soro hiperimune foi capaz de reconhecer rOmpL37, tornando-o um insumo útil para caracterização da vacina de DNA construída. Contudo, foi verificada a presença de bandas adicionais no WB, maiores que 37 kDa, até então não visualizadas com os anticorpos anti-6xHis e soro humano convalescente. Isto pode

ser consequência da presença de proteínas de *E. coli*, em pequenas quantidades, nas alíquotas da purificação de rOmpL37. Estas proteínas podem ter composto a preparação utilizada na imunização dos camundongos, resultando nas reações positivas verificadas no WB, o que possivelmente reduz a especificidade dos anticorpos presentes no soro produzido.

A linhagem de células CHO-K1 se mostrou adequada para o ensaio de transfecção. A vacina de DNA construída foi funcional e a proteína OmpL37 foi expressa nas células mamíferas, não apresentando nenhum sinal de citotoxicidade visível ao microscópio. A eficiência da transfecção, por outro lado, pode ser otimizada através da utilização de uma quantidade maior de DNA e de Nanofect, bem como pelo aumento do tempo de incubação com o transfectante para 48h, conforme descrito em outros trabalhos avaliando OmpL1 e LipL21 (MANEEWATCH, et al., 2007; HE, et al., 2008). Além disso, pretendemos avaliar a expressão da proteína através de WB, utilizando o extrato de células CHO-K1 não transfectadas como controle e o soro hiperimune produzido, de modo a confirmar que não ocorre reação cruzada do soro hiperimune anti-OmpL37 com proteínas das células em cultivo.

Neste trabalho, nós construímos vetores recombinantes funcionais capazes de expressar a proteína OmpL37 em sistema procarioto e eucarioto, apresentando potencial para serem empregados no desenvolvimento de vacinas recombinantes visando o controle da leptospirose. Pretendemos, ainda, avaliar o potencial imunoprotetor de OmpL37 como vacina de subunidade e como vacina de DNA em modelo de hamster, através de teste desafio, utilizando a estratégia de *prime-boost*, já estabelecida por nosso grupo de pesquisa, bem como, avaliar a resposta imune induzida diante destas imunizações.

7. Conclusões

- A metodologia utilizada para clonagem de *ompL37* nos vetores pAE e pTARGET é eficiente, gerando construções funcionais capazes de expressar a proteína em células procarióticas e eucarióticas, respectivamente.

- A proteína rOmpL37 é reconhecida por soro humano convalescente, sugerindo que esta proteína manteve epitopos antigênicos presentes em sua forma nativa. Esse resultado indica que o processo de expressão e purificação provavelmente não alterou substancialmente sua conformação e confirma a expressão de OmpL37 durante a infecção do hospedeiro.

- A proteína rOmpL37 é capaz de induzir a produção de anticorpos nos animais imunizados e o soro hiperimune produzido é capaz de reconhecer rOmpL37.

- O vetor pTarget/*ompL37* pode ser utilizado como vacina de DNA já que a expressão de OmpL37 ocorre em células animais.

- O gene *ompL37* está presente entre diferentes sorovares de leptospirosas patogênicas, tornando promissora sua utilização para o desenvolvimento de vacinas contra leptospirose que gerem proteção cruzada contra esses diferentes sorovares.

- Estudos subsequentes serão executados com o objetivo de avaliar o potencial imunoprotetor de OmpL37 como vacina de DNA e de subunidade contra leptospirose, através de teste desafio homólogo e heterólogo em modelo animal suscetível.

8. Referências

ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet Microbiol**, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.

ADLER, B.; LO, M.; SEEMANN, T.; MURRAY, G. L. Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics. **Vet Microbiol**, v.153, n.1-2, p.73-81, 2011.

AHMAD, S. N.; SHAH, S.; AHMAD, F. M. Laboratory diagnosis of leptospirosis. **J Postgrad Med**, v.51, n.3, p.195-200, 2005.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; GONCALES, A. P.; SILVA, A. S.; DAHA, M. R.; ISAAC, L. Immune evasion of leptospira species by acquisition of human complement regulator c4bp. **Infect Immun**, v.77, n.3, p.1137-1143, 2009.

BAROCCHI, M. A.; KO, A. I.; REIS, M. G.; MCDONALD, K. L.; RILEY, L. W. Rapid translocation of polarized mdck cell monolayers by leptospira interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect Immun**, v.70, n.12, p.6926-6932, 2002.

BARRAGAN, V. A.; MEJIA, M. E.; TRAVEZ, A.; ZAPATA, S.; HARTSKEERL, R. A.; HAAKE, D. A.; TRUEBA, G. A. Interactions of leptospira with environmental bacteria from surface water. **Curr Microbiol**, v.62, n.6, p.1802-1806, 2011.

BHARTI, A. R.; NALLY, J. E.; RICALDI, J. N.; MATTHIAS, M. A.; DIAZ, M. M.; LOVETT, M. A.; LEVETT, P. N.; GILMAN, R. H.; WILLIG, M. R.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Leptospirosis: A zoonotic disease of global importance. **Lancet Infect Dis**, v.3, n.12, p.757-771, 2003.

BOURHY, P.; LOUVEL, H.; SAINT GIRONS, I.; PICARDEAU, M. Random insertional mutagenesis of leptospira interrogans, the agent of leptospirosis, using a mariner transposon. **J Bacteriol**, v.187, n.9, p.3255-3258, 2005.

BRANGER, C.; CHATRENET, B.; GAUVRIT, A.; AVIAT, F.; AUBERT, A.; BACH, J. M.; ANDRE-FONTAINE, G. Protection against leptospira interrogans sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. **Infect Immun**, v.73, n.7, p.4062-4069, 2005.

BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRE-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of leptospira interrogans by adenovirus-mediated vaccination. **Infect Immun**, v.69, n.11, p.6831-6838, 2001.

CASTIBLANCO-VALENCIA, M. M.; FRAGA, T. R.; SILVA, L. B.; MONARIS, D.; ABREU, P. A.; STROBEL, S.; JOZSI, M.; ISAAC, L.; BARBOSA, A. S. Leptospiral immunoglobulin-like proteins interact with human complement regulators factor h, fh1-1, fhr-1, and c4bp. **J Infect Dis**, v.205, n.6, p.995-1004, 2012.

CHARON, N. W.; GOLDSTEIN, S. F. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes. **Annu Rev Genet**, v.36, p.47-73, 2002.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A., JR.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic leptospira species: Disruption of the ligb gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infect Immun**, v.76, n.12, p.5826-5833, 2008.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiol Rev**, v.28, n.3, p.291-318, 2004.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of leptospira spp. **Infect Immun**, v.73, n.8, p.4853-4863, 2005.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p.in press, 2011.

DOLHNIKOFF, M.; MAUAD, T.; BETHLEM, E. P.; CARVALHO, C. R. Pathology and pathophysiology of pulmonary manifestations in leptospirosis. **Braz J Infect Dis**, v.11, n.1, p.142-148, 2007.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. Leptospira as an emerging pathogen: A review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiol**, v.5, n.9, p.1413-1425, 2010.

FAISAL, S. M.; YAN, W.; CHEN, C. S.; PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; CHANG, Y. F. Evaluation of protective immunity of leptospira immunoglobulin like protein a (liga) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, v.26, n.2, p.277-287, 2008.

FENG, C. Y.; LI, Q. T.; ZHANG, X. Y.; DONG, K.; HU, B. Y.; GUO, X. K. Immune strategies using single-component lipL32 and multi-component recombinant lipL32-41-ompl1 vaccines against leptospira. **Braz J Med Biol Res**, v.42, n.9, p.796-803, 2009.

FIGUEIRA, C. P.; CRODA, J.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Heterologous expression of pathogen-specific genes liga and ligB in the saprophyte leptospira biflexa confers enhanced adhesion to cultured cells and fibronectin. **BMC Microbiol**, v.11, p.129, 2011.

FLANNERY, B.; COSTA, D.; CARVALHO, F. P.; GUERREIRO, H.; MATSUNAGA, J.; DA SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G.; RILEY, L. W.; REIS, M. G.; HAAKE, D. A.; KO, A. I. Evaluation of recombinant leptospira antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **J Clin Microbiol**, v.39, n.9, p.3303-3310, 2001.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: Aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scand J Immunol**, v.73, n.5, p.408-419, 2011.

GANOZA, C. A.; MATTHIAS, M. A.; SAITO, M.; CESPEDES, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. M. Asymptomatic renal colonization of humans in the peruvian amazon by leptospira. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.2, p.e612, 2010.

GIRONS, I. S.; BOURHY, P.; OTTONE, C.; PICARDEAU, M.; YELTON, D.; HENDRIX, R. W.; GLASER, P.; CHARON, N. The le1 bacteriophage replicates as a plasmid within leptospira biflexa: Construction of an I. Biflexa-escherichia coli shuttle vector. **J Bacteriol**, v.182, n.20, p.5700-5705, 2000.

GOLDSTEIN, S. F.; CHARON, N. W. Motility of the spirochete leptospira. **Cell Motil Cytoskeleton**, v.9, n.2, p.101-110, 1988.

GOUVEIA, E. L.; METCALFE, J.; DE CARVALHO, A. L.; AIRES, T. S.; VILLASBOAS-BISNETO, J. C.; QUEIRROZ, A.; SANTOS, A. C.; SALGADO, K.; GRASSMANN, A. A.; FELIX, S. R.; DOS SANTOS, C. X.; AMARAL, M. G.; SEIXAS NETO, A. C.; FAGUNDES, M. Q.; SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; CONCEICAO, F. R.; DELLAGOSTIN, O. A. Protection against lethal leptospirosis after vaccination with lipl32 coupled or co-administered with b subunit of escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Clin Vaccine Immunol**, 2012.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Leptospira: A spirochaete with a hybrid outer membrane. **Mol Microbiol**, 2010.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins omp11 and lipl41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infect Immun**, v.67, n.12, p.6572-6582, 1999.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.4, p.494-501, 2011.

HARTWIG, D. D.; OLIVEIRA, T. L.; SEIXAS, F. K.; FORSTER, K. M.; RIZZI, C.; HARTLEBEN, C. P.; MCBRIDE, A. J.; DELLAGOSTIN, O. A. High yield expression of leptospirosis vaccine candidates liga and lipl32 in the methylotrophic yeast pichia pastoris. **Microb Cell Fact**, v.9, p.98, 2010.

HE, H. J.; WANG, W. Y.; WU, Z. D.; LV, Z. Y.; LI, J.; TAN, L. Z. Protection of guinea pigs against leptospira interrogans serovar lai by lipl21 DNA vaccine. **Cell Mol Immunol**, v.5, n.5, p.385-391, 2008.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C.; AULT, S. K.; PERIAGO, M. R. The neglected tropical diseases of latin america and the caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.9, p.e300, 2008.

JOST, B. H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **J Med Microbiol**, v.22, n.3, p.269-275, 1986.

JOUGLARD, S. D. M., M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; DA CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. . An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. . **Abstracts American Society for Microbiology**, v.71, n.234, 2002.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. Leptospira: The dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nat Rev Microbiol**, v.7, n.10, p.736-747, 2009.

LAMBERT, A.; PICARDEAU, M.; HAAKE, D. A.; SERMSWAN, R. W.; SRIKRAM, A.; ADLER, B.; MURRAY, G. A. FlaA proteins in leptospira interrogans are essential for motility and virulence but are not required for formation of the flagellum sheath. **Infect Immun**, v.80, n.6, p.2019-2025, 2012.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LIAO, S.; SUN, A.; OJCIUS, D. M.; WU, S.; ZHAO, J.; YAN, J. Inactivation of the fliY gene encoding a flagellar motor switch protein attenuates mobility and virulence of leptospira interrogans strain lai. **BMC Microbiol**, v.9, p.253, 2009.

LILENBAUM, W.; DOS SANTOS, M. R. [leptospirosis in animal reproduction: lii. Role of the hardjo serovar in bovine leptospirosis in rio de janeiro, brazil]. **Rev Latinoam Microbiol**, v.37, n.2, p.87-92, 1995.

LIN, Y. P.; LEE, D. W.; MCDONOUGH, S. P.; NICHOLSON, L. K.; SHARMA, Y.; CHANG, Y. F. Repeated domains of leptospira immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **J Biol Chem**, v.284, n.29, p.19380-19391, 2009.

MALMSTROM, J.; BECK, M.; SCHMIDT, A.; LANGE, V.; DEUTSCH, E. W.; AEBERSOLD, R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen leptospira interrogans. **Nature**, v.460, n.7256, p.762-765, 2009.

MANEEWATCH, S.; TAPCHAISRI, P.; SAKOLVAREE, Y.; KLAYSING, B.; TONGTAWE, P.; CHAISRI, U.; SONGSERM, T.; WONGRATANACHEEWIN, S.; SRIMANOTE, P.; CHONGSA-NGUANZ, M.; CHAICUMPA, W. Omp1 DNA vaccine cross-protects against heterologous leptospira spp. Challenge. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v.25, n.1, p.75-82, 2007.

MATSUI, M.; SOUPE, M. E.; BECAM, J.; GOARANT, C. Differential in vivo gene expression of major leptospira proteins in resistant or susceptible animal models. **Appl Environ Microbiol**, 2012.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.18, n.5, p.376-386, 2005.

MERI, T.; MURGIA, R.; STEFANEL, P.; MERI, S.; CINCO, M. Regulation of complement activation at the c3-level by serum resistant leptospire. **Microb Pathog**, v.39, n.4, p.139-147, 2005.

MIDWINTER, A.; FAINE, S.; ADLER, B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (lps) and lps-derived immuno-conjugates from leptospira interrogans. **J Med Microbiol**, v.33, n.3, p.199-204, 1990.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clin Microbiol Rev**, v.22, n.2, p.240-273, Table of Contents, 2009.

MURRAY, G. L.; MOREL, V.; CERQUEIRA, G. M.; CRODA, J.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; BULACH, D. M.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; PICARDEAU, M. Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic leptospira species. **Infect Immun**, v.77, n.2, p.810-816, 2009.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; HARTSKEERL, R. A.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B. Mutations affecting leptospira interrogans lipopolysaccharide attenuate virulence. **Mol Microbiol**, v.78, n.3, p.701-709, 2010.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HENRY, R.; PUAPAIROJ, A.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B. *Leptospira interrogans* requires heme oxygenase for disease pathogenesis. **Microbes Infect**, v.11, n.2, p.311-314, 2009.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HOKE, D. E.; WUNDER, E. A., JR.; HENRY, R.; LO, M.; ZHANG, K.; SERMSWAN, R. W.; KO, A. I.; ADLER, B. Major surface protein lipL32 is not required for either acute or chronic infection with *leptospira interrogans*. **Infect Immun**, v.77, n.3, p.952-958, 2009.

NAIMAN, B. M.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Protective killed *leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent th1 immunity comprising responses by cd4 and gammadelta t lymphocytes. **Infect Immun**, v.69, n.12, p.7550-7558, 2001.

NAIMAN, B. M.; BLUMERMAN, S.; ALT, D.; BOLIN, C. A.; BROWN, R.; ZUERNER, R.; BALDWIN, C. L. Evaluation of type 1 immune response in naive and vaccinated animals following challenge with *leptospira borgpetersenii* serovar hardjo: Involvement of wc1(+) gammadelta and cd4 t cells. **Infect Immun**, v.70, n.11, p.6147-6157, 2002.

NASCIMENTO, A. L.; KO, A. I.; MARTINS, E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; HO, P. L.; HAAKE, D. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; HARTSKEERL, R. A.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C. F.; LEITE, L. C.; CARRER, H.; COUTINHO, L. L.; DEGRAVE, W. M.; DELLAGOSTIN, O. A.; EL-DORRY, H.; FERRO, E. S.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GAMBERINI, M.; GIGLIOTI, E. A.; GOES-NETO, A.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; HARAKAVA, R.; JERONIMO, S. M.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; KIMURA, E. T.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; MARINO, C. L.; NUNES, L. R.; DE OLIVEIRA, R. C.; PEREIRA, G. G.; REIS, M. S.; SCHRIEFER, A.; SIQUEIRA, W. J.; SOMMER, P.; TSAI, S. M.; SIMPSON, A. J.; FERRO, J. A.; CAMARGO, L. E.; KITAJIMA, J. P.; SETUBAL, J. C.; VAN SLUYS, M. A. Comparative genomics of two *leptospira interrogans* serovars reveals novel insights into physiology and pathogenesis. **J Bacteriol**, v.186, n.7, p.2164-2172, 2004.

NASCIMENTO, A. L.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VAN SLUYS, M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; CAMARGO, L. E.; DIGIAMPIETRI, L. A.; HARSTKEERL, R. A.; HO, P. L.; MARQUES, M. V.; OLIVEIRA, M. C.; SETUBAL, J. C.; HAAKE, D. A.; MARTINS, E. A. Genome features of *leptospira interrogans* serovar copenhageni. **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.4, p.459-477, 2004.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein a against *leptospira interrogans* serovar pomona infection. **Infect Immun**, v.74, n.3, p.1745-1750, 2006.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; SAINT GIRONS, I. First evidence for gene replacement in *leptospira* spp. Inactivation of *I. Biflexa* flab results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Mol Microbiol**, v.40, n.1, p.189-199, 2001.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MEDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte leptospira biflexa provides insights into the evolution of leptospira and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One**, v.3, n.2, p.e1607, 2008.

PINNE, M.; CHOY, H. A.; HAAKE, D. A. The omp137 surface-exposed protein is expressed by pathogenic leptospira during infection and binds skin and vascular elastin. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.9, p.e815, 2010.

PINNE, M.; HAAKE, D. A. A comprehensive approach to identification of surface-exposed, outer membrane-spanning proteins of leptospira interrogans. **PLoS One**, v.4, n.6, p.e6071, 2009.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of leptospira spp. In humans. **Microbes Infect**, v.2, n.10, p.1265-1276, 2000.

RADDI, G.; MORADO, D. R.; YAN, J.; HAAKE, D. A.; YANG, X. F.; LIU, J. Three-dimensional structures of pathogenic and saprophytic leptospira species revealed by cryo-electron tomography. **J Bacteriol**, v.194, n.6, p.1299-1306, 2012.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Impact of environment and social gradient on leptospira infection in urban slums. **PLoS Negl Trop Dis**, v.2, n.4, p.e228, 2008.

REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, salvador, brazil. **Emerg Infect Dis**, v.14, n.3, p.505-508, 2008.

RICALDI, J. N.; VINETZ, J. M. Leptospirosis in the tropics and in travelers. **Curr Infect Dis Rep**, v.8, n.1, p.51-58, 2006.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; DA CRUZ MCBRIDE, F. W.; FIGUEIRA, C. P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I. S.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. The ompa-like protein loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathog**, v.3, n.7, p.e97, 2007.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospira. **Microbiology**, v.154, n.Pt 5, p.1309-1317, 2008.

SEIXAS, F. K.; DA SILVA, E. F.; HARTWIG, D. D.; CERQUEIRA, G. M.; AMARAL, M.; FAGUNDES, M. Q.; DOSSA, R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. Recombinant mycobacterium bovis bcg expressing the lip132 antigen of leptospira interrogans protects hamsters from challenge. **Vaccine**, v.26, n.1, p.88-95, 2007.

SEIXAS, F. K.; FERNANDES, C. H.; HARTWIG, D. D.; CONCEICAO, F. R.; ALEIXO, J. A.; DELLAGOSTIN, O. A. Evaluation of different ways of presenting lip132 to the

immune system with the aim of developing a recombinant vaccine against leptospirosis. **Can J Microbiol**, v.53, n.4, p.472-479, 2007.

SILVA, E. F.; MEDEIROS, M. A.; MCBRIDE, A. J.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES, G. S.; RAMOS, J. G.; SANTOS, C. S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN, O. A.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein liga confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v.25, n.33, p.6277-6286, 2007.

SRIKRAM, A.; ZHANG, K.; BARTPHO, T.; LO, M.; HOKE, D. E.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B.; MURRAY, G. L. Cross-protective immunity against leptospirosis elicited by a live, attenuated lipopolysaccharide mutant. **J Infect Dis**, v.203, n.6, p.870-879, 2011.

VERMA, A.; KUMAR, P.; BABB, K.; TIMONEY, J. F.; STEVENSON, B. Cross-reactivity of antibodies against leptospiral recurrent uveitis-associated proteins a and b (Irua and Irub) with eye proteins. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, n.8, p.e778, 2010.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: An emerging global public health problem. **J Biosci**, v.33, n.4, p.557-569, 2008.

VINETZ, J. M. Leptospirosis. **Curr Opin Infect Dis**, v.14, n.5, p.527-538, 2001.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb Cell Fact**, v.6, p.39, 2007.

WERTS, C.; TAPPING, R. I.; MATHISON, J. C.; CHUANG, T. H.; KRAVCHENKO, V.; SAINT GIRONS, I.; HAAKE, D. A.; GODOWSKI, P. J.; HAYASHI, F.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D. M.; KIRSCHNING, C. J.; WAGNER, H.; ADEREM, A.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a tlr2-dependent mechanism. **Nat Immunol**, v.2, n.4, p.346-352, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication**. Malta, 2003. 122p.

ZUERNER, R. L.; ALT, D. P.; PALMER, M. V.; THACKER, T. C.; OLSEN, S. C. A leptospira borgpetersenii serovar hardjo vaccine induces a th1 response, activates nk cells, and reduces renal colonization. **Clin Vaccine Immunol**, v.18, n.4, p.684-691, 2011.

ZUERNER, R. L.; HERRMANN, J. L.; SAINT GIRONS, I. Comparison of genetic maps for two leptospira interrogans serovars provides evidence for two chromosomes and intraspecies heterogeneity. **J Bacteriol**, v.175, n.17, p.5445-5451, 1993.